

令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

加熱式たばこエアロゾルが生体に及ぼす影響に関する実験的検討

分担研究者 牛山 明 国立保健医療科学院
分担研究者 中舘 和彦 明治薬科大学
研究協力者 服部 研之 明治薬科大学

研究要旨

加熱式たばこは、発生する有害化学物質量を低減しているとされているが、化学物質の複合ばく露は変わらず起こるため健康への影響が懸念される。しかし動物等に加熱式たばこ主流煙を適切にばく露する装置がなく実験系が組めないという理由のため、実験動物を用いた研究は少ない。我々はこれまでに加熱式たばこ用の動物ばく露装置を開発してばく露実験を実施してきた。本年度は同装置を用いて、マウスに IQOS のエアロゾルばく露を行い、1) 血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2) テレメトリー法による心拍への影響、3) 病理組織解析の3つの研究を実施した。

加熱式たばこばく露は、一部の指標において、生体影響と考えられる変化をもたらしたが、本研究ではばく露期間が最大でも4週間のばく露であったため、健康影響を検索するためには、さらに長期間のばく露・高用量のばく露などの条件による研究が必要であると考えられた。

A. 研究目的

加熱式たばこの普及による健康リスクを推定するために生物学的研究は必須である。しかしながら、加熱式たばこはこれまでの燃焼式たばこは煙の発生機序が異なるため、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要である。我々は、in vivo 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を明らかにしてきた。本年度は同装置を用いてマウスにエアロゾルばく露をした際の1) 血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2) テレメトリー法による心拍への影響、3) 病理組織解析を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 加熱式たばこばく露装置およびばく露方法

本研究では当研究室で開発した加熱式たばこばく露装置(1)を使用した(図1および図2)。本装置では、様々な喫煙プロトコルを設定できるが、本研究では、Health Canada Intensive (HCI) プロトコルを用いた。使用する加熱式たばことして、デバイスは IQOS3 Duo、IQOS ヒートスティックは Marlboro レギュラーをすべての研究を通じて使用した。

なお、昨年度までの研究で、ばく露の際に筒状のホルダーにいと拘束ストレスによると思われる影響が強かったため、今年度は動物を保定しない(自由度の高い)ばく露用のホルダーでばく露を行った(図3)。これまでと異なるばく露法であるが、尿のニコチン代謝物の分析に基づけば高いばく露条件が達成されていることが示され

た。

2. 血中サイトカイン濃度の網羅的解析

加熱式たばこばく露の血液をマウスの頬静脈から一定量採血し、血漿を回収した。なお、採血のタイミングは、一連のばく露を開始する前、ばく露を2週間行った直後、ばく露を4週間行った直後の計3回であり、ばく露は1日10本(スティック)のばく露をおこなった群(以下、10S群とする。)と1日20本のばく露をおこなった群(20S群)、ばく露を行わずホルダーに入れ、空気をばく露した群(Air群)、何も行わない群(Control群)とした。

サイトカインの定量は Biolegend 社の LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) with Filter Plate キットおよび BECKMAN COULTER 社のフローサイトメーターCytoFLEX を使用し、サイトカインに特異的に結合したビーズの APE 及び PE の蛍光強度から、各サイトカインの濃度を求めた。

検出限界値以上の濃度と判定されたサイトカインについて統計解析ソフト SPSS を使用し、各群の統計解析をおこなった。統計処理は各群が等分散であると仮定して一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、 $p < 0.05$ の項目について post hoc 解析を実施した。

3. マウス心電図の取得及び解析

あらかじめ、加熱式たばこばく露装置で、1日20本のばく露を3週間行い、エアロゾルばく露に馴化したマウス (C57BL/6N) を用意した。毎日のばく露を実施しつつ、心電図を取得する実験の48時間前までに、外科的に埋め込み型マウス心電図送信器(ソフトロン)を装着した。対照としては、加熱式たばこエアロゾルに全くさらされていないマウスを用意した。実験直前に図3で示したホルダーにマウスを1匹だけ入れ、ホルダーを心電図受信ボードの上に置きばく露を行った。送信機

からのアナログ信号を PowerLab4/26 (AD Instruments) を介して A/D 変換を行い PC に取り込んだ。取り込んだデジタルデータは、LabChartPro ソフトウェアおよび内臓の ECG 解析モジュール (AD Instrument) で処理および解析を行った。なお、マウスの心拍数は平時で 600~700 拍/分 (10~12 拍/秒) であるため、データの取得レートは 1kHz とした。

4. 病理組織解析

電子顕微鏡を用いた微細病理組織解析

これまでの検討において、光学顕微鏡を用いた病理組織解析と透過型電子顕微鏡を使用した病理組織解析を行ってきた。過年度までの解析対象は、肺胞上皮細胞を主体におこなってきたが、今年度は、炎症や様々な異物を処理する肺胞マクロファージに焦点を当て計測した。本研究では、IQOS ばく露マウスとコントロールマウスの肺の一部を用いて解析した。解析は、日本電子製の IT-800SHL を使用した。それぞれの肺組織をエポキシ樹脂に置換し、100nm 厚に薄切した後、スライドガラスに載せた後、電子染色を施した。その後、オスmiumコートを施し、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、検鏡、撮影し、微細構造変化を解析した。

5. 倫理的配慮

動物実験は、国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得て実施された。

C. 結果及び考察

1. マウスのばく露装置と化学物質の定量

本研究では我々が独自に開発したばく露装置を用いてエアロゾルを発生させ実験を行った (図1、図2)。昨年度まではマウスを細いホルダーに入れてばく露を行ったが、拘束ストレスがあったため、今年度は図3のばく露ホルダーで実施した。

同ホルダーにマウスを入れて IQOS を 10 本ばく

露した後に、ばく露終了から1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、6時間後の5点において採尿した。その後、尿サンプルを所定の方法で分析しコチニンと3-ヒドロキシコチニンを定量した。その結果、コチニンはばく露終了2時間後、3-ヒドロキシコチニンはばく露終了4時間後をピークとして検出された(図4)。過去に拘束型ホルダーで実施したばく露と同等ないしはそれ以上の値であり、図3の非拘束型ホルダーを用いても十分なばく露量が確保できた。

2. 血中サイトカインへの影響

検出限界値より高い濃度が示された炎症性サイトカインはIL-1 α 、IL-1 β 、IL-10の3つであったため、この3つに注目して解析を進めた。IL-1 α は加熱式たばこばく露によって、血漿中の濃度が増加する傾向がみられた。しかし数値のばらつきが大きくANOVA解析を行った結果は2週間ばく露、4週間ばく露の血漿ともに有意差は認められなかった。

IL-1 β では加熱式たばこばく露の有無による違いは見られなかったが、IL-10では加熱式たばこばく露によって血漿中が濃度の抑制される傾向が見られた。ANOVA分析において2週間ばく露の血漿では有意差は認められなかったが、4週間ばく露の血漿では20S群とAir群において有意($p=0.031$)が認められた(図5)。そのほかのサイトカインは定量的な検出が不可能であったためマルチプレックス法において感度および精度向上のための検討が必要であると考えた。

これまでに、我々は今回と同じ装置を用いて、マウスに短期ばく露の影響(1日5本を最大4日間)を調べている。その際にはばく露によるIL-6およびGM-CSFの濃度の増加が認められた(2)。また、Bhatらは、1日20本のIQOSエアロゾルを2週間暴露した際に、肺胞洗浄液からTNF- α 、IFN- γ 、KCの増加を報告している(3)。これらより、加熱式たばこのばく露は、生体内に炎症を引き起

こす可能性が考えられる。

3. 心拍への影響

昨年度の研究において、拘束型ホルダーに入れエアロゾルばく露をした直後に一過性の期外収縮が見られた。本年度は、長期間のばく露をおこないエアロゾルばく露に馴化したマウスを用い、かつ、非拘束型ホルダーでも同様な現象が起こるのか否かについて検討をした。

マウスに1日あたり加熱式たばこ20本のエアロゾルを3週間以上にわたりばく露をし、馴化した後に、心電図を記録しながらエアロゾルばく露の影響を調べたところ、エアロゾルのパフ直後に期外収縮が見られ、馴化によってその現象が消失することはなかった(図6)。しかしながら、この影響は一過性のものであり可逆的であった。

加熱式たばこや電子たばこエアロゾルに含まれるニコチンには、その薬理的な作用で心血管系にさまざまな影響を引き起こすことが知られている。ニコチンは内皮機能不全、アドレナリン作動性ニューロンからのノルエピネフリン放出、および副腎エピネフリン放出を誘発し、全身循環および冠循環の血管収縮を引き起こす可能性がある(4, 5)。ニコチンによる持続的な交感神経活性化も心筋リモデリングに寄与する可能性がある、心室細動、リモデリング、線維症の発症を促進することが動物実験で示されており(6)、本研究で見られた影響もニコチンによるものの可能性が考えられる。しかしながら、今回でのデータでは、加熱式たばこの2秒のパフのあとの28秒のインターバルの間、さらには1本のスティックをばく露したあとのインターバルの間に変化がベースラインに戻る現象が見られている。この間、体内のニコチンレベルは大きな変動はないと考えられるため、ニコチン以外の有害性を持つ成分による影響の可能性も考えられる。馴化したマウスを用いても同様の減少が起こることは、長期間のばく露でも心臓は同様の応答をし続ける可能

性を示しており、心臓の肥大化や線維化を通じて心不全などの疾病につながる原因になりうることを示唆している。一方で、人とマウスで心臓の解剖学的構造や、ニコチンに対する感受性の違いも指摘されていることにも注意が必要である。

4. 電子顕微鏡 (SEM) による病理組織解析

本研究では、SEM を用いて網羅的に肺組織を観察し、肺泡マクロファージの密度と形態解析をおこなった。その結果であるが、まず図7に肺泡像をしめす。さらに定量結果を図8左に示すように、コントロールと比較し IQOS ばく露では、肺泡マクロファージ細胞の数が増えていることが示された。さらに、観察された肺泡マクロファージの細胞内を観察すると、IQOS ばく露の肺内の肺泡マクロファージ細胞では、有意に異物除去を行なっている過程、すなわち消化している像が多数認められた。この過程像を持つ細胞を計測した結果を図8右に示すが、有意に IQOS ばく露群が多いことが示された。

IQOS のエアロゾル成分には紙巻きたばこに比べ、有害化学物質は一定程度低減しているため、どのような作用機序で肺泡マクロファージが、どのような物質を分解しているのかについては、今後詳細な検討を要すると考えている。

これらの結果から、IQOS ばく露群の肺泡マクロファージでは、なんらかの異物を処理していると考えられる。この異物を確かめるために、IT-800SHL に搭載した元素マッピング解析を行った。

図9にその結果の一例を示すが、空胞内の素性では、IQOS ばく露群でC (炭素) が多い傾向が示されている。ガラス板 (SiO_2) 上に組織を採取し、アルミニウム (Al) の台を使用し、 OsO_4 をコーティングしているため、それらの元素が多量に検出されているが、それらを除くと有意な違いはC (炭素) のようである。肺泡マクロファージがカーボンを含んだ炭化物、もしくは有機物を異物とみなし、処理を行なっている可能性が考えられる。こ

の異物処理が正常範囲内、すなわち生体内の処理能力内であれば、身体にとって不都合は生じないと考えられるが、この処理過程が能力以上となった場合には、泡沫化し、肺の組織に炎症など様々な影響をもたらす可能性が示唆される。

このような微小変異が個体差ではなく普遍的な変化であるか本格的な解析を行うことが今後必要であると考えられる。さらに、このようなマイクロの肺の構造変化と肺の炎症との関連を明らかにすることが可能であると考察される。

D. 結論

本研究では、加熱式たばこ専用の動物用ばく露装置を用いて動物実験を実施した。本装置を用いてマウスに IQOS 主流煙をばく露したところ、1日あたり 20 本のばく露を4週間継続した際に、血液中の IL-10 において有意な減少が見られた。現象が認められた。一方で、マウスの覚醒下 (非拘束条件) で、テレメトリーによる ECG を記録したところ、IQOS エアロゾルのパフの直後、数秒間にわたって期外収縮が観察された。この現象は1日 20 本のエアロゾルばく露を3週間以上にわたり行ったマウスにおいても観察され、エアロゾルに馴化しても影響が消失することはなかった。これらの影響は実験した範囲においてはばく露終了後にベースラインに戻る可逆的な変化であったが、このような変化が繰り返し起こることにより、心臓にストレスが生じ、疾病につながる可能性も否定できないため、今後の検討が必要である。

また、組織学的観察においては、IQOS ばく露によって、肺泡マクロファージが肺泡マクロファージ細胞の数が増えている所見がみられた。また、元素分析によると肺泡マクロファージがカーボンを含んだ炭化物ないしは有機物を異物とみなし処理を行っていることを示唆するデータが見られた。この異物処理が常態生理学的な範囲以上となった場合には、肺泡マクロファージは泡沫化し、肺の組織に炎症など様々な影響をもたらす

可能性が示唆される。

以上より、限定的な実験結果ではあるが動物に加熱式たばこのばく露を行った際の影響について、生化学的、生理学的、解剖学的観点からは、炎症に起因する影響が示唆された。今後はより長期的なばく露の影響について明らかにする必要がある。

E. 引用文献

(1) Sawa M, Ushiyama A, Inaba Y, Uchiyama S, Hattori K, Ogasawara Y, Ishii K. A Newly Developed Aerosol Exposure Apparatus for Heated Tobacco Products for In Vivo Experiments Can Deliver Both Particles and Gas Phase With High Recovery and Depicts the Time-Dependent Variation in Nicotine Metabolites in Mouse Urine. *Nicotine Tob Res.* 2021 Nov 5;23(12):2145-2152. doi: 10.1093/ntr/ntab123. PMID: 34111284.

(2) Sawa M, Ushiyama A, Inaba Y, Hattori K. Increased oxidative stress and effects on inflammatory cytokine secretion by heated tobacco products aerosol exposure to mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jun 25;610:43-48.

(3) Bhat TA, Kalathil SG, Leigh N, Muthumalage T, Rahman I, Goniewicz ML, Thanavala YM. Acute Effects of Heated Tobacco Product (IQOS) Aerosol Inhalation on Lung Tissue Damage and Inflammatory Changes in the Lungs. *Nicotine Tob Res.* 2021 Jun 8;23(7):1160-1167.

(4) El-Mahdy MA, Mahgoup EM, Ewees MG, Eid MS, Abdelghany TM, Zweier JL. Long-term electronic cigarette exposure induces cardiovascular dysfunction similar to tobacco cigarettes: role of nicotine and

exposure duration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021 May 1;320(5):H2112-H2129.

(5) Benowitz NL, Burbank AD. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for electronic cigarette use. *Trends Cardiovasc Med.* 2016 Aug;26(6):515-23.

(6) Jensen K, Nizamutdinov D, Guerrier M, Afroze S, Dostal D, Glaser S. General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis. *FASEB J.* 2012 Dec;26(12):4778-87. doi: 10.1096/fj.12-206458.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

進藤佐和子, 高橋知里, 西川史織, 二瓶まどか, 塚田航大, 中舘和彦, 稲葉洋平, 牛山明, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルのマウスへのばく露手法の検討. フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー ; 2023.9.12-13 ; 広島. 同講演要旨集 Page 181.

牛山明, 稲葉洋平. 加熱式たばこエアロゾルばく露時にマウスの ECG に生じる一過性の影響について. 第 94 回日本衛生学会学術総会; 2024.3.7-3.9; 鹿児島. 日本衛生学雑誌第 79 巻 (Suppl.) S267.

3. その他

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

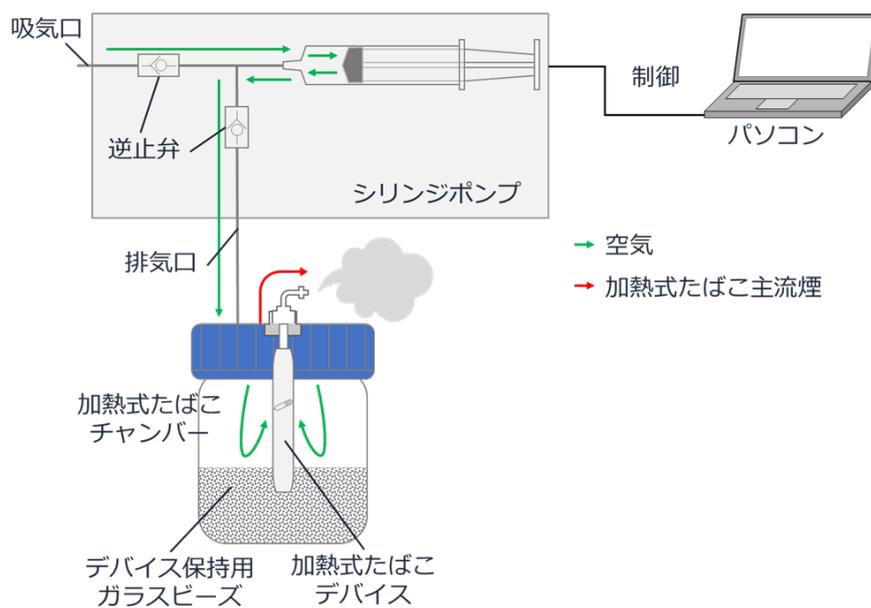


図1 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置（概念図）

ばく露装置全体の概念図を示す。加熱式たばこデバイスはたばこスティックを入れた状態で密閉されたチャンバー内に固定する。ばく露装置はコンピューターで様々な喫煙法で制御可能であり、本研究では国際規格に則り、一定の空気量（55 mL）を一定の間隔（30 秒ごと）でスティック 1 本あたり 12 回排気する。送気された空気はデバイスを通じてスティックの吸い口からエアロゾルとして排出される。

(A)



(B)

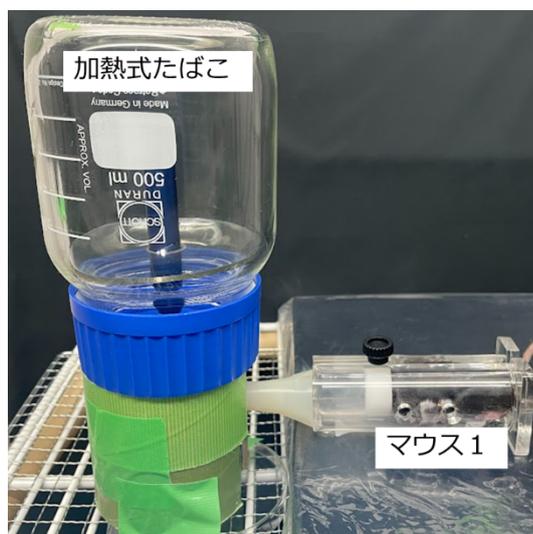


図2 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置

(A) ばく露装置の全体写真を示す。(B)IQOS デバイスおよびスティックをセットした状態の加熱式たばこチャンバーを示す。1 ポートばく露の場合は、写真のようにマウスを配置してばく露を行う。(C) 4 ポートばく露の際にはエアロゾルの出口を4分岐した上で、保定器に入れたマウスを4匹配置する。(D) 4 ポートばく露の際のマウスの配置状況（例として右側2匹のみを示す。左側も同様にマウスを配置する。

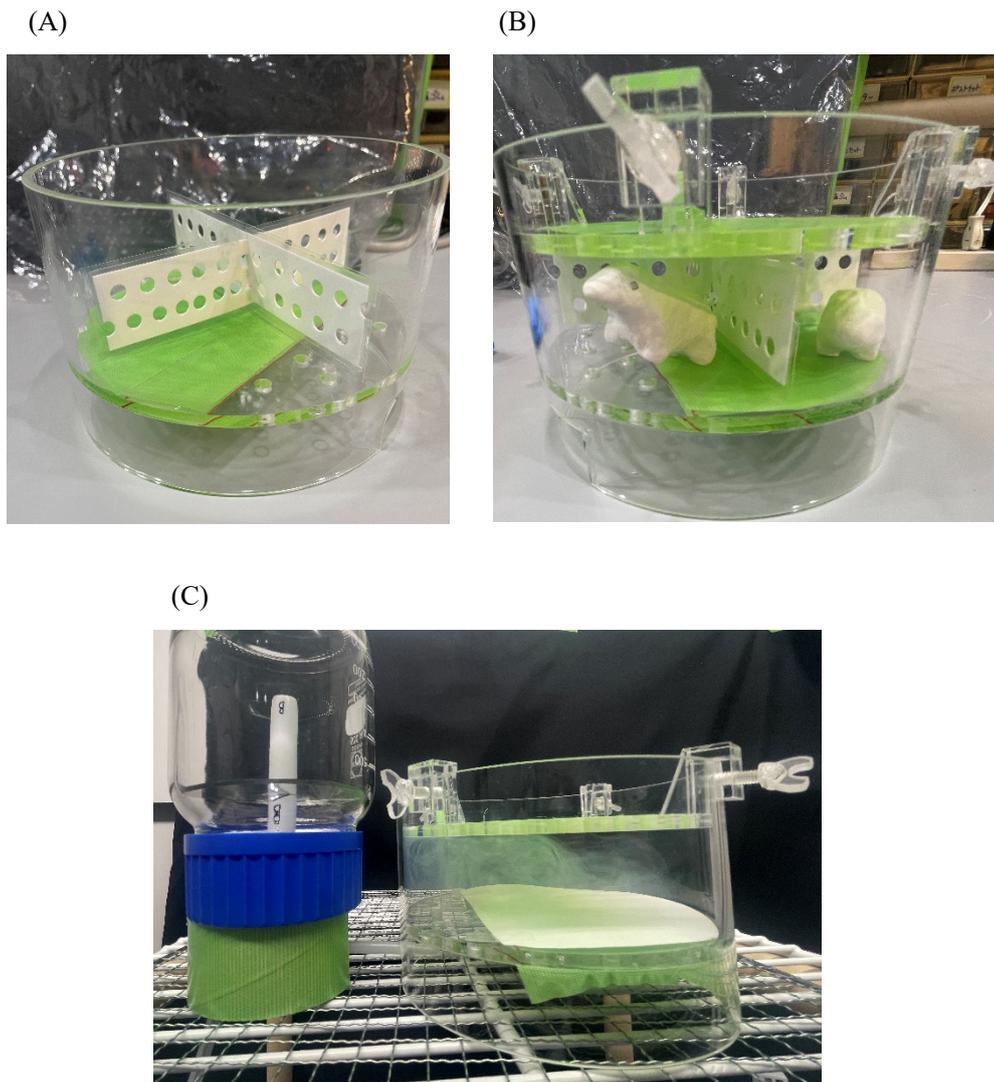


図3 動物用ばく露装置に接続する非拘束ホルダー

(A) ホルダー全体を示す。このホルダーは外径 150mm で、内部を通気性のよい仕切りで 4 等分ないし 5 等分に仕切りそれぞれの小部屋の行き来を阻害し、マウスのファイティングを防止した。(B)ホルダーにマウス模型を入れた状態。(C) ばく露装置からエアロゾルをホルダーに導入している様子。この写真では仕切りとマウスを入れていないが、実際のばく露では仕切りで区切りばく露を行う。

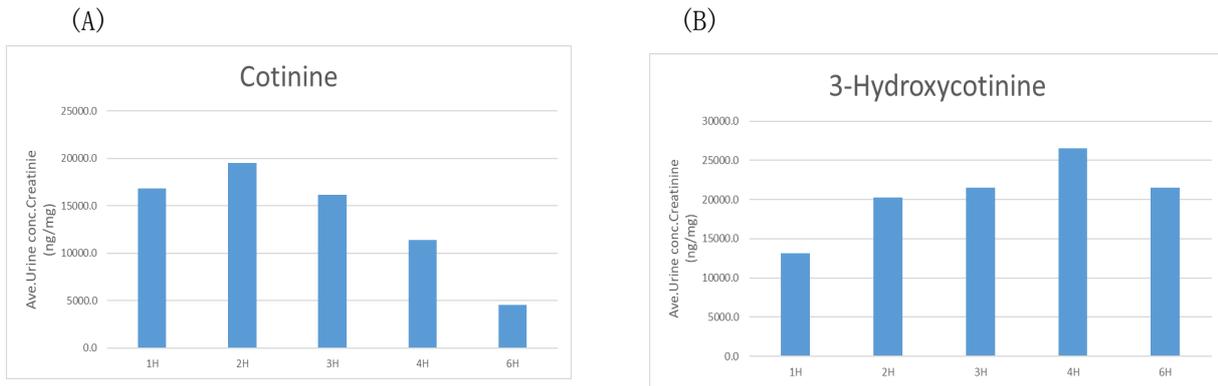


図4 10本分のエアロゾルばく露後に尿へ排泄されるニコチン代謝物濃度の時間変化
 (A) コチニン (Cotinine) の濃度の経時変化。(B) 3-ヒドロキシコチニン (3-Hydroxycotinine) の濃度変化。いずれも、尿中のクレアチニン量による補正後の数値を示す。ばく露に用いたマウスは5匹であるが、各タイムポイントで尿を排泄しなかった個体もいたため、各タイムポイントでのデータは2~5個である。

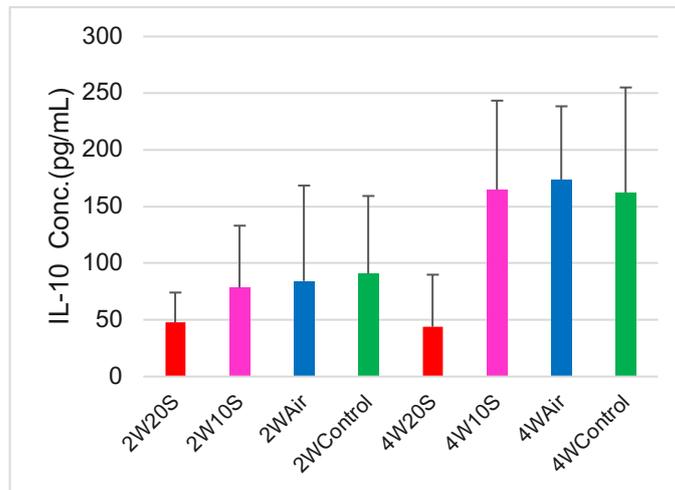
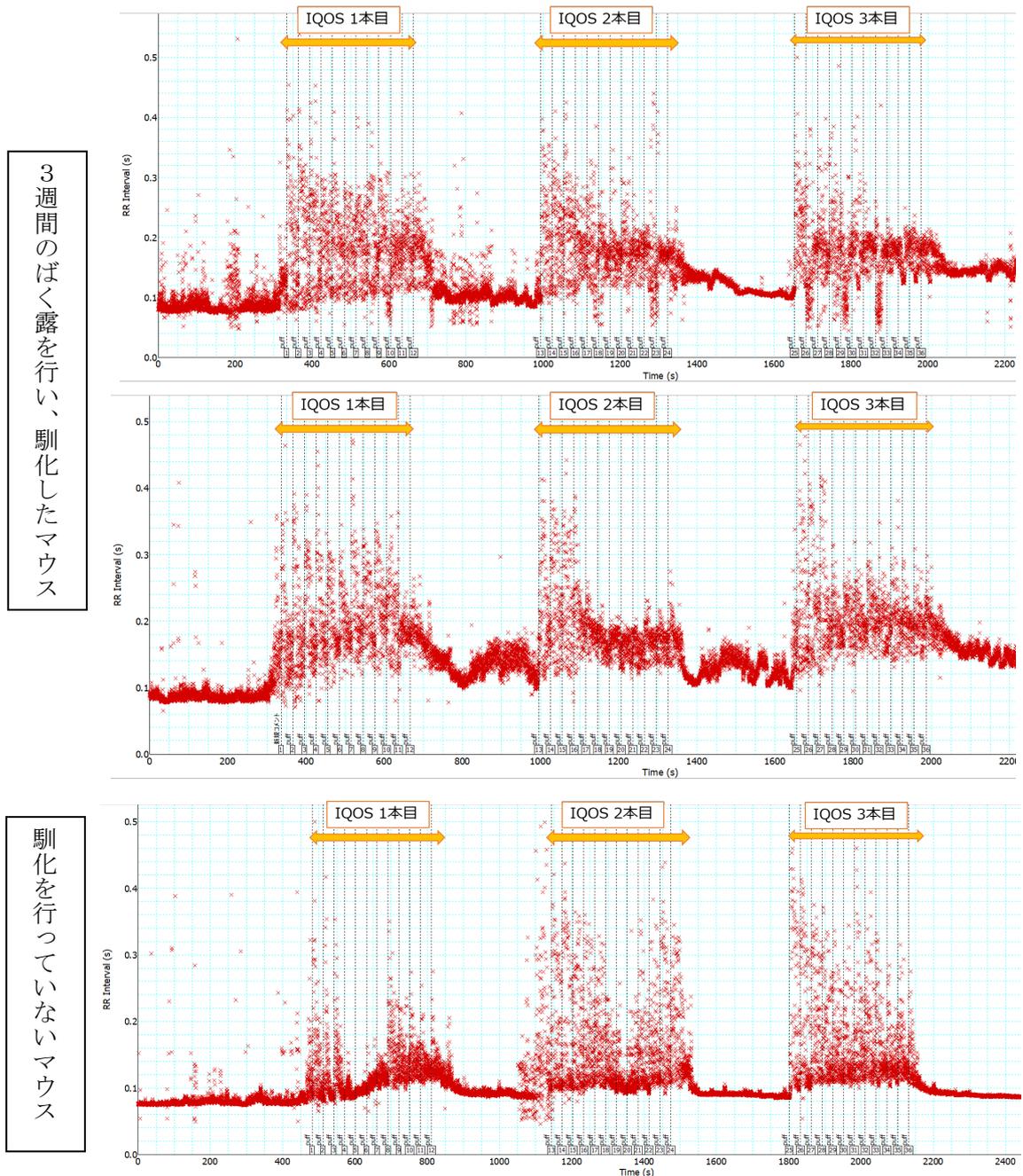


図5 血漿中の IL-10 濃度
 横軸の表記はそれぞれ、2W20S (20本/日を2週間)、2W10S (20本/日を2週間)、2WAir (空気ばく露を2週間)、4W20S (20本/日を4週間)、4W10S (10本/日を4週間)、4WAir (空気ばく露を4週間)、4WControl (ケージコントロール) を示す。データは Mean ± SD (N=5 each) で示す。



3週間のばく露を行い、馴化したマウス

馴化を行っていないマウス

図6 IQOSを連続で3本ばく露した際のRR間隔の変化

IQOSを一定のインターバルをおいて連続で3本ばく露した際に記録された心電図をもとに1拍ごとのRR間隔をプロットした。IQOSのばく露中はパフ毎に変動が見られたが、ばく露が終わるとベースラインに戻り、次のばく露が始まると、再度RR間隔の乱れが見られた。図中の黄色の矢印はIQOS1本分のばく露時間（6分間）を示す。上2つは馴化を行ったマウスの例（異なる2匹）、下は馴化を行っていないマウスの例を示す。

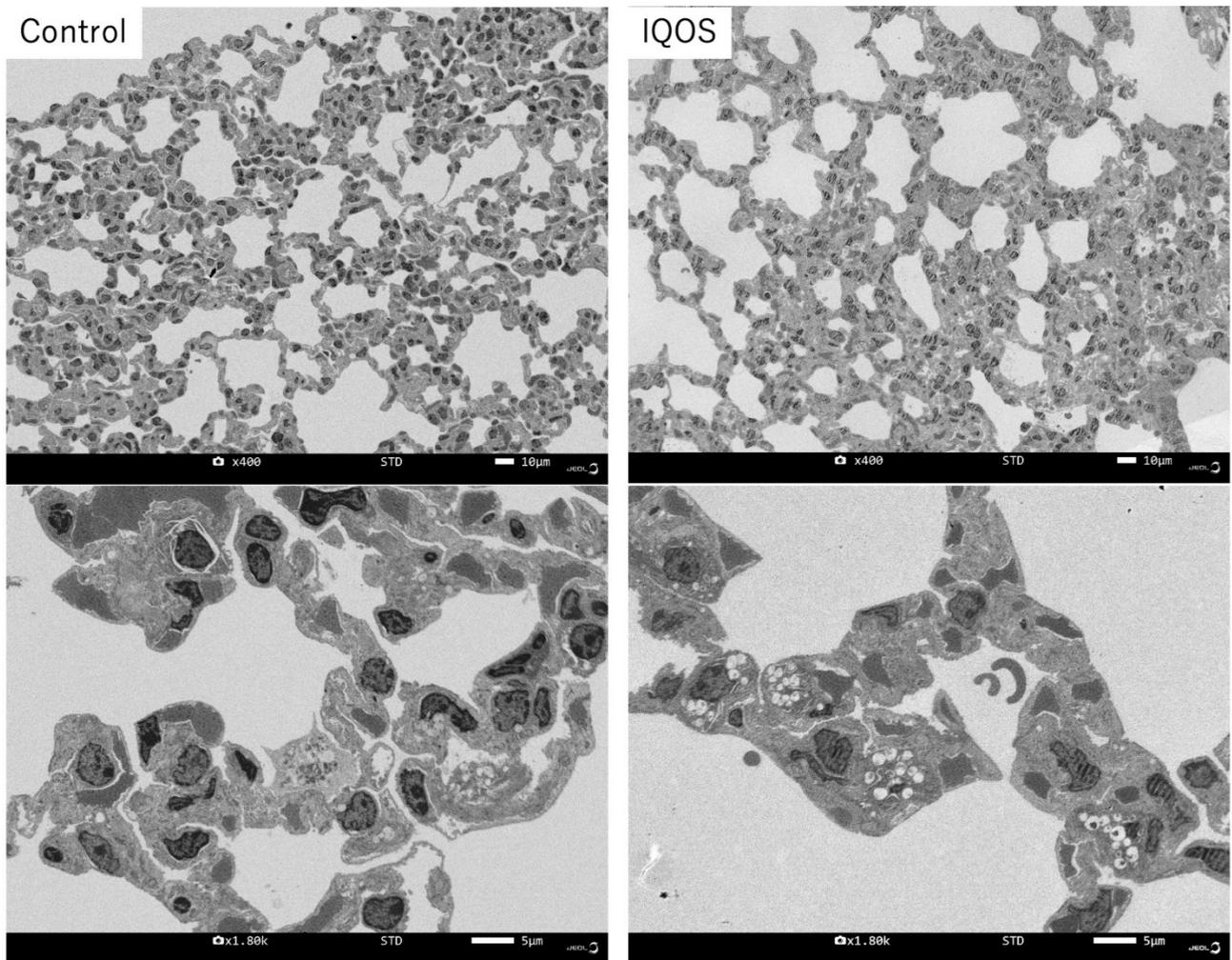


図7 加熱式エアロゾルばく露後の電子顕微鏡像

コントロールの肺では、肺胞上皮細胞においても異常構造は認められない。加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウスの肺では、コントロールの肺同様に正常構造であるが、肺胞マクロファージの細胞が多く観察された。また肺胞マクロファージ内には空胞が多数認められた。

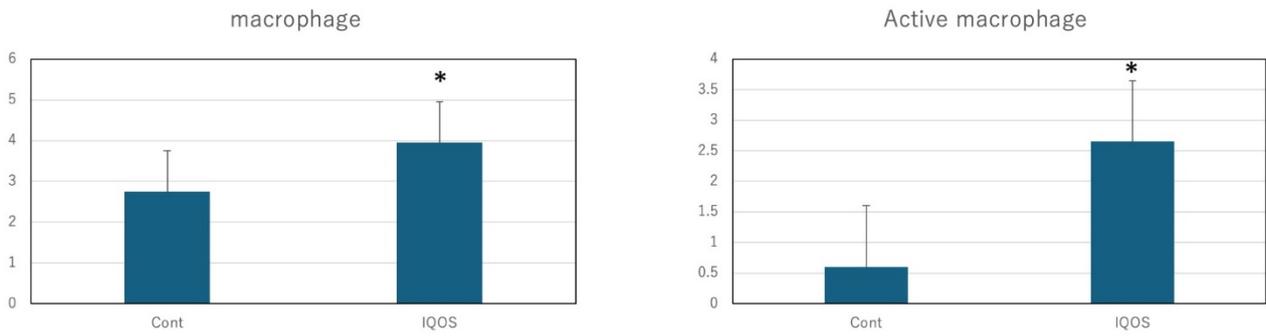
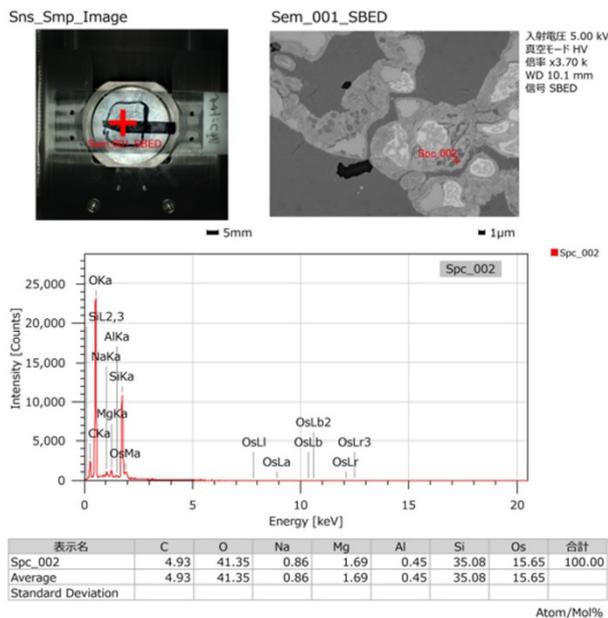


図8 電子顕微鏡の画像解析の結果

左はマクロファージの出現数を示し、コントロール肺と比較し、加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウスの肺では肺胞マクロファージが増加していた。右は肺胞マクロファージ内に空胞が認められた細胞数を示す。コントロールマウスでは非常に少ない細胞数であるが、加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウス肺では肺胞マクロファージ細胞内に多数の空胞が観察される細胞が増加していた。

Control



IQOS

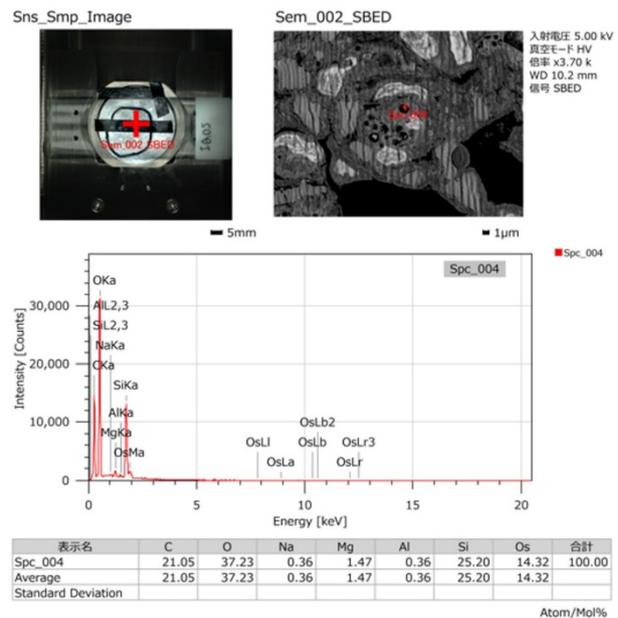


図9 肺胞マクロファージ内に観察された空胞内の元素分析結果

コントロールと比較し、IQOS ばく露マウス肺のマクロファージでは、炭素が有意に増加していることが明らかになった。炭素を含む構成物を処理しているものと示唆される。